

Sjemenarstvo 25 (2008) 1

UDK: 631.671.3, 633.111 (045)=862

Pregledni znanstveni rad

MEHANIZMI TOLERANTNOSTI BILJAKA NA SUŠU I NJIHOVA GENSKA OSNOVA KOD PŠENICE

Snježana KERESHA, Marijana BARIĆ, Martina HORVAT, Ivanka HABUŠ JERČIĆ

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Faculty of Agriculture University of Zagreb

SAŽETAK

Tolerantnost na sušu je kompleksno svojstvo nekih vrsta i genotipova biljaka, a određeno je različitim morfološkim i/ili fiziološkim odlikama. Tolerantni genotipovi sušu mogu prevladati na više načina: (1) ranim dozrijevanjem (mekanizam izbjegavanja suše), (2) zatvaranjem puči što sprječava preveliku transpiraciju, ali reducira i fotosintezu (mekanizam smanjenja dehidracije), ili (3) pojačanim nakupljanjem različitih osmolita koji održavaju turgor biljke i omogućavaju normalan metabolizam i u uvjetima vodnog stresa (mekanizam tolerantnosti na dehidraciju). Vrlo važna sposobnost tolerantnih biljaka je obrana od oksidativnog stresa kao sastavnog dijela vodnog stresa. Većina gena odgovornih za tolerantnost na sušu ima inducibilne promotore, a hormon abscizinska kiselina (ABA) je signal koji ih u dosta slučajeva aktivira. Kod pšenice je identificirano više lokusa za kvantitativna svojstva (QTL-a) povezanih sa svojstvom tolerantnosti, a nalaze se na različitim kromosomima. Osim u klasičnu selekciju tolerantnih genotipova, veliki naponi se ulažu i u genetičke modifikacije biljaka za bolju tolerantnost. Genetički modificirana pšenica pokazala je veliku tolerantnost na sušu u poljskim pokusima.

Ključne riječi: suša, mehanizmi tolerantnosti, pšenica, genetičke modifikacije

UVOD

Suša je jedan od važnih abiotskih stresova, a gubici u proizvodnji usjeva zbog suše, na svjetskoj razini, dostižu vrijednost i do 10 milijardi dolara godišnje (G u h a - S a p i r i sur., 2004). Godine sa sušnim razdobljima i u Hrvatskoj se sve češće pojavljuju i uzrokuju velike gubitke prinosa različitih kultura. Kod pšenice ti gubici mogu iznositi 14-50% (B a r i ć i sur., 2008). Selekcija genotipova tolerantnih na sušu (vodni stres) postaje zbog toga vrlo važan cilj u oplemenjivanju bilja. S oplemenjivačke točke gledišta, tolerantnost genotipova na stres može se opisati kao sposobnost

zadržavanja konstantno visokog prinosa (stabilnost prinosa), bez obzira na nepovoljne okolinske uvjete. Tolerantnost genotipova na nedostatak vlage u tlu (sušu) je kompleksna odlika i može se postići ako genotip posjeduje jedan od slijedećih mehanizama: (1) mehanizam za izbjegavanje suše, (2) mehanizam za smanjenje dehidracije, (3) mehanizam za tolerantnost na dehidraciju.

MEHANIZAM ZA IZBJEGAVANJE SUŠE

Izbjegavanje suše je morfološki fenomen koji se postiže ranim dozrijevanjem. Genotipovi raznih vrsta kultiviranog bilja koje odlikuje ovaj fenomen ranozrelosti završe životni ciklus prije nastupa razdoblja intenzivne suše, a postižu to pojačanom metaboličkom aktivnošću i ubrzanim rastom (McKay i sur., 2003). Selekcija genotipova za svojstva koja omogućuju intenzivan rast i ubrzani razvoj kao što su: visoka provodljivost puči, visoka fotosintetska aktivnost, niska djelotvornost korištenja vode (WUE) i rana cvatnja omogućit će ranozrelost, a time i izbjegavanje suše. Ranozrelost uključuje pravovremenu cvatnju koja je određena major genima odgovornima za fotoperiodizam, jarovizaciju i "ranozrelost per se".

Geni povezani s fotoperiodizmom u pšenici, ali i ječmu, su *Ppd*. Kod pšenice su *Ppd* geni (*Ppd-A1*, *Ppd-B1*, i *Ppd-D1*) smješteni na kraćem kraku kromosoma 2A, 2B i 2D (Laurie i sur., 1995). Istraživanja su pokazala da dominantna alelna forma *Ppd-A1* gena, neosjetljiva na fotoperiod, kod ozimih pšenica izloženih kratkom danu može ubrzati cvatnju za 7 dana u odnosu na genotipove s recesivnom alelnom formom istog gena. Međutim, geni za fotoperiod imaju plejotropan učinak. Djeluju također na skraćenje stabljike i redukciju broja klasića u klasu, što je direktna posljedica skraćenog razdoblja vegetacije koja rezultira smanjenjem uroda i do 5%. Žitarice koje zahtijevaju jarovizaciju kasne s cvatnjom ili ne cvatu ako nisu bile izložene niskim temperaturama. Geni povezani s jarovizacijom su *Vrn* geni, a najvažniji od njih su *Vrn-A1*, *Vrn-B1* i *Vrn-D1* smješteni na dužem kraku kromosoma 5A, 5B i 5D (Galiba i sur., 1995). "Ranozrelost per se" kod pšenice kontrolirana je genima tzv. *Eps*.

MEHANIZAM ZA SMANJENJE DEHIDRACIJE

Smanjenje dehidracije je drugi mehanizam kojim se biljka bori s nedostatkom vlage u tlu, a predstavlja zapravo fiziološku prilagodbu (McKay i sur., 2003). Genotipovi koji posjeduju mehanizam za smanjenje dehidracije imaju nisku metaboličku aktivnost, sporiji rast te visok vodni potencijal i turgor u stanicama tijekom razdoblja suše. Navedeno se događa zbog progresivnog zatvaranja puči, što za posljedicu ima smanjenje transpiracije (time i dehidracije), ali i smanjenje fotosinteze. Selekcijom za ovaj mehanizam tolerantnosti treba favorizirati genotipove koji imaju nisku provodljivost puči (Mooney i sur., 1976). Zatvaranje puči nije kontrolirano samo dostupnom vodom u tlu, već i interakcijom čimbenika unutar i izvan lista

(M e d r a n o i sur., 2002). Kemijski signal koji se sintetizira u korijenu kao odgovor na isušivanje tla, putuje ksilemom do lista i potiče zatvaranje puči je abscizinska kiselina (ABA) (D a v i e s i Zhang, 1991). Uloga ABA-e, međutim, nije sasvim jednostavna i rijetko je nađena direktna korelacija između sadržaja ABA-e u ksilemu i provodljivosti puči. Osjetljivost puči na ABA-u mogu modificirati vodni potencijal lista, status hranjiva u biljci i pH biljnog soka u ksilemu. Major QTL (lokus za kvantitativno svojstvo) koji utječe na sušom inducirano nakupljanje ABA-e u biljnom tkivu mapiran je na dužem kraku kromosoma 5A kod pšenice u neposrednoj blizini lokusa koji kontrolira otpornost na smrzavanje (Dhn/Dhn2) (Q u a r r i e i sur., 1994).

MEHANIZAM ZA TOLERANTNOST NA DEHIDRACIJU

Tolerantnost na dehidraciju predstavlja zapravo tolerantnost na promjene koje suša izaziva na razini stanica i molekula. Biljke to postižu osmotskom regulacijom. Osmotska regulacija definirana je kao smanjenje osmotskog potencijala u stanici zbog aktivnog nakupljanja određenih osmolita (osmoprotektanata) tijekom smanjenog vodnog potencijala u listu. Aktivna akumulacija raznih osmolita u stanicama omogućuje da se procesi koji ovise o turgoru nastave do neke mjere i u stresnim uvjetima. Tako osmotska regulacija tolerantnim genotipovima izloženima suši omogućuje: (1) nastavak izduživanja listova, iako smanjenim intenzitetom, (2) ostanak puči otvorenih te njihovu bolju provodljivost i odvijanje fotosinteze, (3) nastavak rasta korijena i stoga bolju eksploataciju vlage iz tla, (4) kasnije venuće listova, (5) bolje nakupljanje suhe tvari i kao posljedicu svega navedenog veći prinos usjeva u stresnim uvjetima. S e r o p i a n i Planchon (1983) stoga naglašavaju da je sposobnost održavanja puči otvorenima, usprkos vodnom stresu, agronomski oblik tolerantnosti na sušu.

Tvari uključene u osmotsku regulaciju razlikuju se kod različitih vrsta, a mogu biti organske ili anorganske (anorganski ioni) prirode. Od anorganskih iona, za osmotsku regulaciju kod pšenice vrlo je važan kalij (K) kako su utvrdili M o r g a n i Tan (1996). U stresnim uvjetima nakupljanje K kontrolirano je major lokusom smještenim na kratkom kraku kromosoma 7A.

Ipak, glavnu ulogu u osmoregulaciji imaju organski osmoliti. Organske osmolite moguće je podijeliti u dvije kategorije: (1) osmolite koji sadrže dušik kao što su slobodne aminokiseline npr. prolin (Pro) ili druge te kvaterni amonijski spojevi kao što su betain, poliamini i proteini; (2) ugljikodidratne osmolite poput šećernih alkohola (manitol, sorbitol), monosaharida (glukoza, fruktoza), oligosaharida (saharoza, trehaloza) te polisaharida (npr. fruktan) (M c C u e i Hanson, 1990).

ORGANSKI OSMOLITI KOJI SADRŽE DUŠIK

Prolin (Pro) i betain sudjeluju u osmoregulaciji biljaka kao odgovor na vodni stres, a štite stanicu na više načina (H u a n g i sur., 2000). Sinteza prolina, npr., povećava

kiselost citoplazme i može održavati odgovarajući odnos $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Hare i Cress, 1997). Smatra se da prolina također stabilizira makromolekule te da predstavlja zalihu ugljika i dušika za korištenje tijekom sušnog razdoblja. Prema istraživanjima Galiba i sur. (1992), geni odgovorni za nakupljanje prolina kod pšenice smješteni su na kromosomima 5A i 5D. Betain stabilizira određene enzime i membrane (Zhao, 1992), te protein-pigment kompleks fotosustava II tijekom stresa. Naylor (2003/4) je istraživao nakupljanje Pro i betaina u dva genotipa pšenice podvrgnuta vodnom stresu. Nakupljanje ovih tvari bilo je dva puta više u biljkama podvrgnutim stresu za razliku od kontrole; k tome, jedan genotip je nakupljao više Pro, a drugi više betaina. Veća koncentracija obaju osmolita nađena je u izdanku u odnosu na korijen. Wang i sur. (2005) istražujući tehnikom mikročipa ekspresiju gena kod pšenice izložene vodnom stresu, a u odnosu na kontrolu, potvrdili su da su među najviše eksprimiranim genima upravo geni za aldehyd-dehidrogenazu i delta-pirolin-5-karboksilat sintetazu. Povišena ekspresija aldehyd-dehidrogenaze povezana je s biosintezom betaina, a delta-pirolin-5-karboksilat sintetaza (P5CS) ključni je pak enzim u biosintezi prolina.

Poliامينi imaju važnu ulogu u rastu i razvoju te obrani od okolinskih stresova. U poliamine spadaju putrescin, spermidin, spermin i dr. Liu i sur. (2003) istraživali su nakupljanje poliamina u klijancima pšenice dvaju genotipova podvrgnutima vodnom stresu te tretmanu polietilen glikola (PEG). Biljke podvrgnute stresu imale su veće koncentracije slobodnog spermidina i spermina, uz napomenu da je nakupljanje ovih tvari kod genotipa tolerantnog na sušu bilo signifikantno veće nego kod osjetljivog genotipa. Ključni enzim u biosintezi spermidina i spermina, S-adenozilmetionin-dekarboksilaza (*TaSAMDC*), aktivira se zbog osmotskog stresa i sušnih uvjeta (Li i Chen, 2000).

Proteini. Jedna skupina proteina nazvana dehidrini ili "late embryogenesis abundant proteins" (LEA D11) (Dure, 1993) identificirana je kao molekularni marker povezan s boljim odlikama genotipova pšenice u sušnim uvjetima. Dehidrini spadaju u familiju proteina eksprimiranih u biljkama izloženima vodnom stresu i dehidraciji. Redovito se nakupljaju u embriju tijekom desikacije. Svi proteini ove familije posjeduju istu konsenzus sekvencu aminokiselina (EKKGIMDKIKELPG) blizu karboksilnog kraja (Close i sur., 1993). Dehidrini su identificirani u najmanje 30 različitih biljnih vrsta uključujući i pšenicu. Danyluk i sur. (1998) pronašli su da se jedna vrsta dehidrina (WCOR410) akumulira blizu stanične membrane tijekom hladne aklimatizacije pšenice i smatraju da to nakupljanje dehidrina štiti integritet (stabilnost) stanične membrane tijekom stresa. Lopez i sur. (2003) proučavali su ekspresiju dehidrina u klijancima sedam različitih genotipova ožime pšenice metodom Western blot. U uvjetima vodnog stresa tolerantni genotipovi eksprimirali su dehidrin već nakon nekoliko dana stresa, a osjetljivi mnogo kasnije. U kontrolnim biljkama dehidrin nije detektiran. Nakupljanje dehidrina u tolerantnim genotipovima bilo je u korelaciji s nakupljanjem suhe tvari u izdancima klijanaca podvrgnutih vodnom stresu, ali i s tolerantnošću na sušu u razdoblju nalijevanja zrna.

UGLJIKOHIDRATNI OSMOLITI

U drugu skupinu organskih tvari koje se nakupljaju u biljkama u sušnim uvjetima spadaju ugljikohidrati. Različiti autori naglašavaju njihovu zaštitnu ulogu protiv stresa, posebice kroz stabilizaciju stanične membrane (H o e k s t r a i sur., 2001). Svi osmoliti (i oni koji sadrže dušik) omogućavaju staničnim proteinima održavanje hidratiziranog stanja tijekom slabijeg vodnog stresa (dehidracija). Međutim, u ekstremnom, daljnjem isušivanju (desikacija), kod tolerantnih biljaka, šećeri se mogu vodikovim vezama vezati na proteine, zamijenjujući tako vodu, te i dalje štiti proteine od denaturacije, što ima za posljedicu održavanje stabilne strukture i integriteta membrana. Sadržaj topivih šećera pokazao se kao bolji marker u selekciji za tolerantnost na sušu kod durum pšenice (*Triticum durum* Desf.) nego prolin (H a k i m i i sur., 1995). Promjenu sadržaja topivih ugljikohidrata u klijancima pšenice izloženima vodnom stresu istraživali su i K e r e p e s i i Galiba (2000). Uočili su pojačano nakupljanje topivih ugljikohidrata – saharoze, glukoze i fruktoze u svim ispitivanim genotipovima u odnosu na kontrolu, ali znatno više koncentracije izmjerene su u tolerantnim genotipovima. Posebno naglašavaju važnost nakupljanja topivih šećera u stabljici, jer ih biljka može u sušnom razdoblju remobilizirati u zrno. Isti autori uočili su i znatno nakupljanje fruktana u klijancima izloženima stresu, ali bez signifikantne razlike među genotipovima. U istraživanju ekspresije gena tehnikom mikročipa nakon izlaganja pšenice vodnom stresu, a u odnosu na kontrolu, Way et al. (2005) pokazali su da je gen za saharoza-sintazu imao vrlo visoku ekspresiju.

ABA koja se normalno nakuplja u tkivu svih biljnih vrsta kao odgovor na sušu, a prethodno je opisana kao signal biljkama za zatvaranje puči (mehanizam smanjenja dehidracije), ima vrlo bitnu ulogu i za osmotsku regulaciju. Naime, geni za sintezu različitih proteina (enzima) odgovornih za osmoregulaciju aktivirani su upravo ABA-om. Analiza sekvence različitih stresom induciranih gena otkrila je da promotori tih gena imaju motive (cis-acting elements) koji reagiraju na specifičan hormon ili okolinske stimulatore te stoga dovode do ekspresije gena (C a t t i v e l l i i sur., 2002). Kod različitih žitarica (pšenica, ječam, riža) nađeni su u promotorima tzv. ABRE elementi koji sadrže ACGT kao središnju nukleotidnu sekvencu za prepoznavanje i vezanje ABA-e. Prvi takav otkriven element je ABRE u promotoru gena *Em1a* pšenice (M a r c o t t e i sur., 1989). *Em* geni spadaju u stresom uvjetovanu skupinu gena LEA grupa 1 eksprimiranu u embriju tijekom desikacije, ali i u mladim klijancima podvrgnutima vodnom stresu, te stresu uslijed slanosti tla.

SUŠA I OKSIDATIVNI STRES

U biljkama izloženim okolinskim stresovima stvaraju se slobodni radikali, a biokemijski su najznačajniji reaktivni oblici kisika (ROS) uključujući superoksid radikal (O_2^-), hidroksi radikal ($\bullet OH$), vodikov peroksid (H_2O_2) te singlet kisik (1O_2). Ozljeđe uzrokovane slobodnim radikalima, nazvane oksidativni stres, jedan su od najvažnijih

štetnih čimbenika u biljkama izloženima stresovima kao što su suša, ekstremne temperature, prejak intenzitet svjetla, zaslanjenost tla, izloženost ozonu, aplikacija herbicida (paraquat) te napad patogena (W a n g i sur., 2005). Kloroplasti su posebno pogođeni slobodnim radikalima jer sadrže relativno visoku koncentraciju kisika koji se reducira elektronima što "pobjegnu" iz fotosustava pretvarajući ga u superoksidni radikal. Slobodni radikali oštećuju različite biološke makromolekule (oksidiraju lipide membrana, denaturiraju proteine i mutiraju DNA) što vodi znatnim oštećenjima stanice, inhibiciji fotosinteze te u konačnici redukciji prinosa. Biljke (kao i drugi organizmi) posjeduju antioksidanse za obranu od slobodnih radikala, a oni mogu biti enzimatski i neenzimatski. Neenzimatski antioksidansi su npr. askorbinska kiselina, α -tokoferol, flavonoidi, glukoza, likopen i dr. Antioksidacijski enzimi - superoksid-dismutaza (SOD), katalaza i glutation-peroksidaza, čini se, ipak imaju važniju ulogu u obrani od slobodnih radikala. SOD djeluje tako da disproporcionira dvije molekule superoksida u kisik i vodikov peroksid, što je prva stepenica u "čišćenju" slobodnih radikala. Druga stepenica je redukcija vodikovog peroksida u askorbat-glutationskom ciklusu u kloroplastima, gdje je donor elektrona NADPH. Superoksid dismutaze klasificirane su prema metalu kojeg sadrže kao kofaktor na: FeSOD, MnSOD i Cu/ZnSOD. Biljke uobičajeno sadrže Cu/ZnSOD u citosolu, FeSOD i/ili Cu/ZnSOD u kloroplastima i MnSOD u mitohondrijima (B o w l e r i sur., 1994).

MORFOLOŠKE ODLIKE TOLERANTNIH GENOTIPOVA

R e y n o l d s i sur. (1999) u CIMMYT-ovom programu oplemenjivanja pšenice za sušu navode još neke važne odlike koje biljkama pomažu prevladavanje sušnih uvjeta:

- (1) Krupno sjeme. Pomaže nicanju, ranom pokrivanju tla i većoj početnoj biomasi.
- (2) Dugačke koleoptile. Pomažu nicanju duboko zasijanog sjemena. Duboka sjetva omogućuje klijancima iskorištavanje vlage iz dubljih slojeva tla te sprječava inhibiciju klijanja uzrokovanu visokim temperaturama površinskog sloja tla.
- (3) Rano prekrivanje tla biljnom masom. Biljke tanjih i širih listova te prostratum rasta bolje prekrivaju tlo što sprječava nagli gubitak vlage. Ranim prekrivanjem površine tla biljnom masom dio te vlage se očuva za kasnije faze rasta (R i c h a r d s , 1996). Boljem prekrivanju tla doprinosi i veća biomasa u stadiju prije klasanja.
- (4) Dobar kapacitet nakupljanja rezervi u stabljici i njihova remobilizacija. Fruktani nakupljeni u stabljici mogu znatno doprinijeti nalijevanju zrna pogotovo kad je fotosinteza inhibirana sušom. Biljke s dužim i debljim internodijima mogu imati ovo svojstvo.
- (5) Visok kapacitet fotosinteze klasa. Klasovi imaju viši WUE nego listovi i fiksiraju i do 40% ugljičnog dioksida tijekom vodnog stresa. Duže pljevice su zato mogući kriterij selekcije za bolju tolerantnost na sušu.
- (6) Robusniji korijen. Korijen također ima važnu ulogu u tolerantnosti na sušu. Pojačanim rastom i često većom biomasom u sušnim uvjetima u odnosu na izdanak,

korijen osigurava biljci dopiranje do dubljih slojeva tla u kojima je veća vjerojatnost postojanja još uvijek raspoložive vode (K e r e š a i sur., 2007).

(7) Anatomija lista. Voštani sloj na listu, pokrivenost dlačicama, sposobnost uvijanja te debljina i položaj lista svojstva su koja mogu smanjiti sunčevu radijaciju na površini lista (R i c h a r d s , 1996). Time doprinose manjoj evapotranspiraciji i smanjuju rizik od ireverzibilne foto-inhibicije. Međutim, ova svojstva mogu smanjiti iskoristivost sunčeve energije u povoljnim uvjetima, što vodi smanjenom prinosu.

(8) Preživljavanje vlati. Usporedbom starih i novih kultivara pokazalo se da stariji kultivari u sušnim uvjetima proizvode puno vlati, ali mnoge od njih ne donesu sjeme, dok moderne, na sušu tolerantne linije produciraju manje vlati od kojih je većina plodonosnih (L o s s i Siddique, 1994).

(9) Dugo zelena stabljika (listovi). Istraživanje na sirku pokazalo je da je svojstvo dugo zelene stabljike povezano s višim sadržajem klorofila te s poboljšanim prinosom i boljom efikasnošću transpiracije u suši (B o r r e l l i sur., 2000). V e r m a i sur. (2004) mapirali su kod pšenice na kromosomu 2B QTL vezan s perzistentnošću zelene površine lista zastavičara, a što je duže i veći postotak površine lista bio zelen, prinos je bio veći.

GENETIČKE MODIFIKACIJE BILJAKA ZA TOLERANTNOST NA SUŠU

U dosadašnjim primjerima genetičkih modifikacija biljaka za tolerantnost na sušne uvjete primijenjen je princip transformacije biljaka genima za enzime koji sudjeluju u biosintezi određenih osmolita (osmoprotektanata) ili antioksidacijskih enzima.

Iako biljne vrste nakupljaju određene osmolite u stresnim uvjetima, njihova koncentracija, zbog slabije ekspresije gena, često nije dovoljna da bi zaštitila biljku od dehidracije. Pojačanom ekspresijom gena koji kodiraju za sintezu nekog osmolita pod utjecajem konstitutivnog promotora npr. CaMV 35S ili nekih drugih možda stresom induciranih promotora, može se postići visoka tolerantnost biljaka na vodni stres. Y a n g i sur. (2005) transformirali su duhan (koji inače nema sposobnost sinteze betaina) genom za betain aldehid-dehidrogenazu iz špinata. Rezultat je bila pojačana akumulacija betaina, uglavnom u kloroplastima, te poboljšana tolerantnost biljaka duhana na visoke temperature. Budući da je betain univerzalna tvar koju nakupljaju različiti organizmi, izvor gena za njegovu sintezu često su i bakterije. U *E. coli* betain je sintetiziran u dvostupnjevitom biosintetskom putu kod kojeg gen *betA* kodira za kolin dehidrogenazu koja oksidira kolin u betainaldehid, a gen *betB* za betain aldehid-dehidrogenazu koja prevodi betainaldehid u betain. Q u a n i sur. (2004) upotrijebili su *betA* gen za transformaciju jedne inbred linije kukuruza. Kao rezultat pojačane akumulacije betaina, kod transgeničnih biljaka izloženih vodnom stresu zabilježili su povećanu masu korijena i izdanaka, bolju asimilaciju CO₂, veći broj i veću masu 1000 zrna. Posljedično, i prinos transgeničnih biljaka bio je veći nego kod kontrolnih (netransformiranih). K a v i K i s h o r i sur. (1995) upotrijebili su gen *P5CS* (za delta-pirolin-5-karboksilat sintetazu) iz biljke *Vigna aconitifolia* za transformaciju duhana.

Gen je bio eksprimiran pod kontrolom CaMV 35S promotora. Pojačana akumulacija prolina, kao posljedica ove transformacije, uzrokovala je veću biomasu i bolji razvoj cvjetova kod transgeničnih biljaka izloženih osmotskom stresu, u odnosu na kontrolne netransformirane biljke. Isti gen Z h u i sur. (1997) stavili su pod kontrolu ABA/stres inducibilnog promotora te ovim konstruktom transformirali rižu. Nakupljanje prolina bilo je 2.5 puta veće nego kod kontrolnih biljaka, a transgenična riža (T₁ generacija) imala je veću masu korijenja i izdanaka u uvjetima vodnog stresa u odnosu na kontrolne biljke.

B a h i e l d i n i sur. (2005) izvještavaju o poljskim pokusima sa pšenicom genetički modificiranom genom *HVA1* za LEA protein (dehidrin) iz aleurona ječma. Naime, S i v a m a n i i sur. (2000) transformirali su pšenicu navedenim genom te u T₃ generaciji (ispitivanja vršena u stakleniku) potomstva utvrdili da transgenične linije imaju višu djelotvornost korištenja vode i veću masu svježeg i suhog korijenja i izdanaka u srednje jakom vodnom stresu u odnosu na kontrolne netransformirane biljke. Bolje performanse navedenih svojstava jasni su pokazatelji tolerantnosti na sušu, što pokazuju i istraživanja K e r e š a i sur. (2008) u kojima je dokazana korelacija između mase suhe i svježeg tvari izdanaka, kao i mase svježeg tvari korijena s prinosom odnosno tolerantnošću na sušu kod pšenice. B a h i e l d i n i sur. (2005) nastavili su ispitivanja dobivenih transgeničnih linija u poljskim pokusima i potvrdili prethodne rezultate.

Šećerni alkohol manitol bio je također predmet genetičkih transformacija u biljkama. Iako ga mnoge biljne vrste, kao npr. celer, normalno sintetiziraju, pšenica ga ne proizvodi. A b e b e i sur. (2003) transformirali su pšenicu genom za manitol-1-fosfat dehidrogenazu (*mtlD*) iz *E.coli*. *MtlD* prevodi fruktozu-6-fosfat u manitol-1-fosfat, kojeg potom nespecifične fosfataze prevode u manitol. U uvjetima vodnog stresa transgeničnim biljkama manje je reducirana masa svježeg i suhog tvari te dužina lista zastavičara u odnosu na kontrolne biljke. Obzirom da razina eksprimiranog manitola u transgeničnim biljkama nije bila visoka, autori smatraju da pozitivan efekt ove ekspresije ne proizlazi samo iz uloge manitola u osmoregulaciji, već i iz antioksidativnog djelovanja manitola tj. uklanjanja hidroksi radikala (•OH) koji agresivno reagiraju s biološkim molekulama uzrokujući peroksidaciju lipida i oštećenje makromolekula poput nukleinskih kiselina.

I drugi ugljikohidratni osmoliti (trehaloza, fruktan), kao i poliamini bili su predmet genetičkih transformacija u svrhu povećanja tolerantnosti biljaka na sušu.

Pojačana ekspresija gena za antioksidacijski enzim superoksid-dismutazu može također povećati otpornost biljaka na različite stresne uvjete pa tako i na sušu. W a n g i sur. (2005) transformirali su rižu genom za proizvodnju MnSOD-a iz graška. Povećanje aktivnosti superoksid dismutaze za 1.4 puta (u odnosu na kontrolne biljke) povećalo je tolerantnost transgenične riže na vodni stres. Indikator tolerantnosti u navedenom istraživanju bio je niži stupanj oštećenja stanične membrane određen metodom propuštanja elektrolita iz stanica.

ZAKLJUČCI

1. Biljke imaju različite mehanizme tolerantnosti na sušu. Najpogodniji s agronomskog stajališta je mehanizam tolerantnosti na dehidraciju koji omogućuje biljkama rast i u uvjetima vodnog stresa;
2. Kod pšenice je identificirano više lokusa za kvantitativna svojstva (QTL-a) povezanih sa svojstvom tolerantnosti na različitim kromosomima. Oni se mogu koristiti kao pomoć u selekciji tolerantnih genotipova;
3. Velik broj gena koji doprinose tolerantnosti biljaka na sušu ima inducibilne promotore, a signal koji ih aktivira je često hormon abscizinska kiselina (ABA);
4. Neke biljne vrste, pa tako i pšenica, genetički su modificirane određenim genima čija ekspresija doprinosi tolerantnosti na sušu. Jedan genotip takve pšenice, transformiran genom za dehidrin iz aleurona ječma, pokazao se vrlo uspješan u poljskim pokusima i uskoro bi mogao ući u proizvodnju kao prva sorta genetički modificirana za tolerantnost na sušu.

DROUGHT TOLERANCE MECHANISMS IN PLANTS AND THEIR GENETIC BASE IN WHEAT

SUMMARY

Drought tolerance is a complex trait of some plant species and genotypes determined by different morphological and/or physiological traits. Tolerant genotypes can circumvent drought in different ways: (1) by early maturity (mechanism of drought escape), (2) by closing stomata that prevents excessive transpiration, but also reduces photosynthesis (mechanism of drought avoidance), or (3) by enhanced accumulation of different osmolites that maintain plant turgor and enable normal metabolism in water stress conditions (mechanism of drought tolerance). The very important is also the ability of tolerant plants to defend against oxidative stress as part of water stress. Most of the genes responsible for tolerance to drought have inducible promoters, and abscisic acid (ABA) is a signal that induces many of them. Many loci for quantitative traits (QTL-s) that control drought tolerance in wheat have been identified and mapped on different chromosomes. Apart from conventional selection for drought tolerance, great efforts have been made to produce genetically modified plants tolerant to drought. Genetically modified wheat showed high drought tolerance in field conditions.

Key words: drought, mechanisms of drought tolerance, wheat, genetic modifications

LITERATURA – REFERENCES

1. Abebe, T., Guenzi, A. C., M. B., Cushman, J. C. (2003): Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 131: 1748-1755.
2. Bahieldin, A., Mahfouz, H. T., Eissa, H. F., Saleh, O. M., Ramadan, A. M., Ahmed, I. A., Dyer, W. E., El-Itriby, H. A., Madkour, M. A. (2005): Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum* 123: 421-427.
3. Barić, M., Kereša, S., Habuš Jerčić, I., Havarđa, S., Gelenčir, D. (2008): Evaluation and characterization of Croatian winter wheat genotypes (*T. aestivum* L.) for drought tolerance. *Cereal Research Communications* 36 (Suppl.) (u tisku).
4. Borrell, A. K., Hammer, R. G., Douglas, A. C. (2000): Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? I. Leaf growth and senescence. *Crop Sci.*, 40: 1026-1037.
5. Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D. (1994): Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13: 199-218.
6. Cattivelli, L., Baldi, P., Crosatti, C., Di Fonzo, N., Faccioli, P., Grossi, M., Mastrangelo, T. A. M., Pecchioni, N., Michele Stanca, A. (2002): Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant Mol. Biol.*, 48: 649-665.
8. Close, T. J., Fenton, R. D., Moonan, F. (1993): A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol. Biol.*, 23: 279-286.
9. Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., Sarhan, F. (1998): Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10: 626-638.
10. Davis, W. J. and Zhang, J. (1991): Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biol.*, 42: 55-76.
11. Dure, III L. (1993): A repeating 11mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.*, 3: 363-369.
12. Galiba, G., Quarrie, S. A., Sutka, J., Morgounov, A., Snape, J. W. (1995): RFLP mapping of the vernalization (*Vrn* 1) and frost resistance (*Fr* 1) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 1174-1179.
13. Galiba, G., Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., Salgo, A., Sutka, J. (1992): Possible chromosomal location of genes determining the osmoregulation of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 415-418.
14. Guha-Sapir, D., Hargitt, D., Hoyois, P. (2004): Thirty Years of Natural Disasters 1974-2003. The Numbers, Presses Universitaires de Louvain: Louvain-la-Neuve.
15. Hakimi, A., Monneveux, P., Galiba, G. (1995): Soluble sugars, proline and relative water content (RWC) as traits for improving drought tolerance and divergent selection for RWC from *T. polanicum* into *T. durum*. *J. Genet. Breed.*, 49: 237-244.
16. Hare, P. D. and Cress, W. A. (1997): Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant. Growth. Regul.*, 21: 79-125.
17. Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., Buitink, J. (2001): Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.*, 6: 431-438.
18. Huang, A. H. C., Hirji, R., Adam, L., Rozwadowski, K. L., Hammerlindl, J. K., Keller, W. A., Selvaraj, G. (2000): Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology* 122: 747-756.
19. Kavi Kishor, P. B., Hong, Z., Miao, G-H., Hu, C-A. A., Verma, D. P. S. (1995): Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108: 1387-1394.
20. Kerepesi, I. and Galiba, G. (2000): Osmotic and salt stress induced alteration in carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Sci.*, 40:482-487.
21. Kereša, S., Barić, M., Šarčević, H., Habuš Jerčić, I., Vujić, V. (2008): Tolerance to drought stress of Croatian winter wheat genotypes at seedling stage. *Cereal Research Communications* 36 (Suppl.) (u tisku).
22. Kereša, S., Barić, M., Šarčević, H., Drezner, G., Ikić, I., Habuš Jerčić, I. (2007): Response of Croatian wheat genotypes to drought stress induced by polyethylene glycol 8000. Book of Abstracts of 42nd International Symposium on Agriculture, February 13-16 2007, Opatija, Croatia, p. 80.
23. Laurie, D. A., Pratchett, N., Bezant, J. H., Snape, J. W. (1995): RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Genome* 38: 575-585.
24. Li, Z. Y. and Chen, S. Y. (2000): Isolation and characterization of a salt- and drought-inducible gene for S-adenosylmethionine decarboxylase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.*, 156: 386-393.
25. Liu, H. P., Dong, B. H., Zhang, Y. Y., Liu, Z. P., Lio, Y. L. (2003): Relationship between osmotic stress and levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. *Plant Science* 166: 1261-1267.
26. Lopez, C. S., Banowitz, G. M., Peterson, C. J., Kronstad, W. E. (2003): Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Science* 43: 577-582.

S. Kereša i sur.: Mehanizmi tolerantnosti biljaka na sušu i njihova genska osnova kod pšenice

27. Loss, S. P. and Siddique, K. H. M. (1994): Morphological and physiological traits associated with wheat yield increases in mediterranean environment. *Adv. Agron.*, 52:229-276.
28. Marcotte, W. R., Russel, S. H., Quatrano, R. S. (1989): Absciscic acid response sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1: 969-976.
29. McCue, K. F. and Hanson, A. D. (1990): Drought and salt tolerance. Towards understanding and application. *Trends Biotech.*, 8: 358-362.
30. McKay, J. K., Richards, J. H., Mitchell-Olds, T. (2003): Genetics of drought adaptation in *Arabidopsis thaliana*. I. Pleiotropy contributes to genetic correlations among ecological traits. *Mol. Ecol.*, 12: 1137-1151.
31. Medrano, H., Escalona, J. M., Bota, J., Gulias, J., Flexas, J. (2002): Regulation of photosynthesis of C₃ plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany* 89: 895-905.
32. Mooney, H. A., Ehleringer, J., Berry, J. A. (1976): High photosynthetic capacity of winter annual in Death Valley. *Science* 194: 322-324.
33. Morgan, J. M. and Tan, M. K. (1996): Chromosomal location of a wheat osmoregulation gene using RFLP analysis. *Aust. J. Plant Physiol.*, 23:803-806.
34. Nayyar, H. (2003/4): Variation in osmoregulation in differentially drought-sensitive wheat genotypes involves calcium. *Biologia Plantarum* 47: 541-547.
35. Quan, R., Shang, M., Zhang, H., Zhao, Y., Zhang, J. (2004): Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize. *Plant Biochemistry Journal* 2: 477-486.
36. Quarrie, S. A., Gulli, M., Calestan, C., Steed, A., Marmioli, N. (1994): Location of gene regulating drought-induced abscisic acid production on the long arm of chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 794-800.
37. Reynolds, M., Skovmand, B., Trethowan, R., Pfeiffer, W. (1999): Evaluating a conceptual model for drought tolerance. In: Ribaut JM (ed) Using molecular markers to improve drought tolerance. CIMMYT, Mexico, DF, pp 49-53.
38. Richards, R. A. (1996): Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regulation* 20: 157-166.
39. Seropian, C. and Planchon, C. (1983): Physiological responses of six bread wheat and durum wheat genotypes to water stress. *Euphytica* 33 (1984): 757-767.
40. Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J. M., Al-Niemi, T., Dyer, W. E., Ho, T-H. D., Qu, R. (2000): Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science* 155: 1-9.
41. Wang, F-Z., Wang, Q-B., Kwon, Suk-Yoon, Kwak, S-S., Su, W-A. (2005): Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxid dismutase. *Journal of Plant Physiology* 162: 456-472.
42. Way, H., Chapman, S., McIntyre, L., Casu, R., Xue, G. P., Manners, J., Shorter, R. (2005): Identification of differentially expressed genes in wheat undergoing gradual water deficit stress using a subtractive hybridisation approach. *Plant Science* 168: 661-670.
43. Yang, X., Liang, Z., Lu, C. (2005): Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 138: 2299-2309.
44. Zhao, Y., Aspinall, D., Paleg, L. G. (1992): Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *J. Plant Physiol.*, 140: 541-543.
45. Zhu, J., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1997): Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16:253-277.

Adresa autora – Authors' address:

Doc. dr. sc. Snježana Kereša
Prof. dr. sc. Marijana Barić
Martina Horvat, dipl. ing.
Ivanka Habuš Jerčić, dipl. ing.
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku, biometriku i eksperimentiranje
Svetošimunska cesta 25, Zagreb
E-mail: skeresaa@agr.hr

Primljeno – Received:

02. 06. 2008.